

Purification of granulocyte preparations useful for transfusion comprises removing nonfunctional granulocytes

Publication number: DE19846011

Publication date: 2000-04-20

Inventor: EMMENDOERFFER ANDREAS (DE); PUELLMANN
KERSTIN (DE); KADAR JANOS (DE)

Applicant: FRAUNHOFER GES FORSCHUNG (DE)

Classification:

- **international:** **C07K1/16; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/28;
C07K1/00; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/18;
(IPC1-7): C07K16/00; C07K1/16; C07K14/435**

- **European:**

Application number: DE19981046011 19981006

Priority number(s): DE19981046011 19981006

[Report a data error here](#)

Abstract of **DE19846011**

Method for purifying a granulocyte-containing preparation comprises removing nonfunctional granulocytes, especially granulocyte progenitor cells, from the preparation. An Independent claim is also included for a granulocyte-containing preparation treated by the method.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 46 011 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/435
C 07 K 1/16

②1 Aktenzeichen: 198 46 011.2
②2 Anmeldetag: 6. 10. 1998
④3 Offenlegungstag: 20. 4. 2000

DE 198 46 011 A 1

⑦1 Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

⑦4 Vertreter:
PFENNING MEINIG & PARTNER GbR, 80336
München

⑦2 Erfinder:
Emmendorffer, Andreas, Dr., 30625 Hannover, DE;
Püllmann, Kerstin, 30455 Hannover, DE; Kadar,
Janos, Dr., 50935 Köln, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
Vet. Immunol. Immunopathol. 1991, 28 (2), S.143-
156;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Aufreinigung von Granulozyten enthaltenden Präparaten

⑤7 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Aufreinigung von Granulozyten enthaltenden Präparaten sowie auf derartig aufgereinigte Granulozyten enthaltende Präparate. Granulozyten enthaltende Präparate werden im Bereich der Transfusionsmedizin, Hämatologie, Onkologie, Pädiatrie und Blutspende beispielsweise zur Therapie von Antibiotika resistenten Infektionen sowie zur Vorbeugung von Infektionen entsprechend gefährdeter Patienten oder auch zur Behandlung von angeborenen Granulozytenfunktionsstörungen verwendet. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die Vorläuferzellen der Granulozyten aus den Präparaten abgetrennt, indem das Präparat mit Annexin V oder Antikörpern, die die Vorläuferzellen erkennen, inkubiert wird und anschließend die an Annexin V bzw. an die Antikörper gebundenen Vorläuferzellen entweder aufgrund einer Markierung des Annexin V oder der Antikörper oder aufgrund einer Bindung des Annexin V oder der Antikörper an ein Trägermaterial, beispielsweise magnetische Beads, abgetrennt werden.

DE 198 46 011 A 1

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Aufreinigung von Granulozyten enthaltenden Präparaten. Derartige Granulozyten enthaltende Präparate werden im Bereich der Transfusionsmedizin, Hämatologie, Onkologie, Blutspende, Pädiatrie, etc. erzeugt bzw. verwendet.

Insbesondere werden Granulozytenpräparate für die Granulozytentransfusion bei der Therapie antibiotisch schwer zu beherrschender Infektionen, bei der Prophylaxe bei Patienten mit hohem Infektionsrisiko oder auch zur Behandlung angeborener Granulozytenfunktionsstörungen beispielsweise in der Pädiatrie eingesetzt.

Die Transfusion von Granulozytenpräparaten ist seit mehreren Jahrzehnten Bestandteil der Therapie antibiotisch schwer zu beherrschender Infektionen. Für die Transfusion werden mindestens 1 bis 2×10^{10} Zellen benötigt. Diese hohe Zahl von Zellen wird von Normalspendern nur selten erreicht, so daß gewöhnlich die Granulozyten aus dem Knochenmark durch Gabe von Steroiden, wie beispielsweise Dexamethason, Prednison oder Methylprednison, mobilisiert werden. Mit Einführung von G-CSF in den klinischen Bereich für die Mobilisation von Granulozyten zur Vorbereitung von Spendern für Granulozytenpräparate konnte die Effizienz der Mobilisierung gegenüber den Steroiden weiter gesteigert werden. Hierbei wird derzeit noch ermittelt, ob den Spendern zur Mobilisation von Granulozyten G-CSF einmal oder wiederholt gegeben werden soll. Der Stand der Technik bei dem Einsatz von Granulozytenpräparaten wird beispielsweise in Emmendoerffer, A. et al. "Kinetics of transfused neutrophils in peripheral blood and BAL fluid of a patient with x-linked chronic granulomatous disease" Eur. J. Haematol, Bd. 47, S. 246-252, 1991, beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Aufreinigung von Granulozyten zur Verfügung zu stellen, um den Reinheitsgrad und die Qualität der zur Granulozytentransfusion verwendeten Präparate zu verbessern, sowie nach diesem Verfahren hergestellte Granulozyten enthaltende Präparate und deren Verwendung zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren nach Anspruch 1, Granulozyten enthaltende Präparate nach Anspruch 11 sowie deren Verwendung nach Anspruch 12 gelöst.

Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Aufreinigung von Granulozyten enthaltenden Präparaten werden aus diesen Präparaten die nicht funktionalen, beispielsweise die chemotaktisch nicht aktiven, in der Sauerstoffradikalproduktion schwachen oder negativen Granulozyten, insbesondere die Vorläuferzellen der Granulozyten abgetrennt. Wesentlich für dieses Verfahren ist die Erkenntnis, daß Granulozyten, die z. B. durch G-CSF beschleunigt aus dem Knochenmark ausgeschüttet wurden und in das periphere Blut gelangten, sich in Abhängigkeit von ihrem Reifungs- und Differenzierungsgrad von normalen neutrophilen Granulozyten in der Expression bestimmter Oberflächenantigene und in ihrer Funktion (Chemotaxis, Sauerstoffradikalproduktion) unterscheiden. Insbesondere bei mehrfacher Gabe von G-CSF erhöht sich hier der Anteil an jungen Granulozyten aus dem Knochenmark. Nebenwirkung der allogenen Granulozytentransfusion ist das Auftreten antigranulozytärer Antikörper im Empfänger, wobei die Wahrscheinlichkeit hierfür und der jeweilige Titer der Antikörper mit der Zahl der transfundierten Präparate korreliert. Zum anderen werden durch die intensive Mobilisation auch Vorläuferzellen von Granulozyten aus dem Knochenmark ausgeschüttet, die im Hinblick auf die Sauerstoffradikalproduktion negativ bzw. signifikant schwächer und außerdem chemotaktisch inaktiv sind. Der Anteil dieser Zellen schwankt in Abhängigkeit von der Art und Dauer der Mobilisation, in Abhängigkeit von der Art der Zellapharese bzw. der Lagerdauer des Präparates zwischen 5% und 80% der Zellen des Präparates. Dies bedeutet eine hohe Variabilität in der Qualität der Präparate, was sowohl für den therapeutischen Erfolg als auch für die mit der Transfusion verbundenen Nebenwirkungen beim Empfänger eine unnötige Belastung darstellt. Durch die Abtrennung der chemotaktisch inaktiven und bei der Sauerstoffradikalproduktion negativ bzw. signifikant schwächeren Vorläuferzellen oder überalterten Granulozyten werden die reifen, funktionell aktiven Granulozyten angereichert und der Anteil funktionell inkompetenter und somit unnötig transfundierter Zellen reduziert. Dies führt zu einer Verminderung der Belastung des Empfängers, da die funktionell inkompetenten Zellen von dessen Makrophagensystem abgebaut werden und gegebenenfalls die Induktion von Alloantikörpern gegen die transfundierten Granulozyten fördern. Es ergibt sich folglich eine bessere Qualität der Granulozyten enthaltenden Präparate und eine damit verbundene bessere Steuerbarkeit der Therapie. Der erhöhte Anteil funktionell aktiver Granulozyten, die transfundiert werden und sofort für die Infektabwehr zur Verfügung stehen, führt zu einer erhöhten therapeutischen Effektivität des Granulozyten enthaltenden Präparates.

Gemäß der vorliegenden Erfindung kann das Verfahren dadurch besonders einfach durchgeführt werden, daß das Granulozyten enthaltende Präparat mit Annexin V oder Antikörpern, die Vorläuferzellen der Granulozyten erkennen, inkubiert wird. Dabei macht man sich die Erkenntnis zunutze, daß die aus dem Knochenmark, z. B. durch G-CSF, Steroide oder ein Kombination aus Steroiden und G-CSF oder durch pflanzliche oder bakterielle Polysaccharide mobilisierten Granulozyten sich gemäß der nachfolgenden Tabelle 1 in einer Reihe von Oberflächenmarkern und Funktionen von den normalen Granulozyten unterscheiden.

Tabelle 1

Veränderung Oberflächenmarker auf G-CSF induzierten Granulozyten im Vergleich zu normalen Granulozyten

Herabregulation	Heraufregulation	Neusynthese
CD16, CD62L	CD11b, CD54, CD95	CD14, CD64, HLA-DR

Die Erfindung macht sich dabei den Umstand zunutze, daß diese Zellen sich in der Durchflußzytometrie neben dem

Scatterprofil (Größe und Granularität) deutlich in der Expression von Phosphatidylserin von normalen Granulozyten unterscheiden. Sie zeichnen sich durch eine äußerst hohe Expression von Phosphatidylserin aus. Diese Expression kann im Durchflußzytometer mittels einer Bindung von beispielsweise FITC-markiertem Annexin V nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis, daß die Vorläuferzellen der Granulozyten Annexin V binden und folglich mit Annexin V markiert werden können, kann nun vorteilhaft zur Abtrennung dieser Vorläuferzellen verwendet werden. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß Annexin V an Trägermaterial gebunden wird und anschließend in der Gegenwart von Kalziumionen das Granulozyten enthaltende Präparat mit dem Trägermaterial in Kontakt gebracht wird. Das Trägermaterial kann dabei auch aus magnetischen Beads bestehen. Geraten die Vorläuferzellen der Granulozyten in Kontakt mit dem Annexin V, so binden sie an dieses und sind folglich auch an das Trägermaterial gebunden. Sie können daher einfach durch Entfernung des Trägermaterials, beispielsweise über ein Magnetfeld zur Entfernung der magnetischen Beads, entfernt werden. Dasselbe Verfahren läßt sich statt mit Annexin V auch mit Antikörpern durchführen, die die Vorläuferzellen der Granulozyten erkennen. Derartige Antikörper sind beispielsweise die Antikörper CD13, CD33, CD117.

Als Alternative hierzu können markiertes Annexin V oder entsprechende markierte Antikörper eingesetzt werden, indem diese mit dem Granulozyten enthaltenden Präparat vermischt werden. Die Vorläuferzellen der Granulozyten binden anschließend an das markierte Annexin V bzw. an die markierten Antikörper und können anschließend aufgrund der Markierung abgetrennt werden. Besonders geeignet ist dabei eine fluorochrome Markierung des Annexin V oder der Antikörper. Diese können anschließend zusammen mit den Vorläuferzellen der Granulozyten beispielsweise durch Chromatographie oder in einem Sorter, aus dem Präparat abgetrennt werden.

Die durch dieses erfindungsgemäße Verfahren aufgereinigten Granulozyten enthaltenden Präparate werden in der Transfusionsmedizin, Hämatologie, Onkologie, Blutspende, Pädiatrie, insbesondere zur Behandlung von antibiotisch schwer zu beherrschenden Infektionen oder zur Prophylaxe von Patienten mit hohem Infektionsrisiko eingesetzt.

Im folgenden werden einige vorteilhafte Ausführungsbeispiele des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Granulozyten enthaltenden Präparate beschrieben. Es zeigen

Fig. 1a den Anteil an Annexin-V-positiven Zellen 24 Stunden nach Gabe von G-CSF (Fall 1) im FSC/SSC-Dotplot;

Fig. 1b denselben Anteil im FL1-Histogramm mit Annexin V-FITC zum Anfärben der Zellen;

Fig. 2a den Anteil Annexin-V-positiver Zellen 48 Stunden nach der Gabe von G-CSF im Blut von Fall 1 im FSC/SSC-Dotplot;

Fig. 2b das zu **Fig. 2a** zugehörige FL1-Histogramm mit Annexin V-FITC zum Anfärben der Zellen;

Fig. 3 den Anteil an Annexin-V-positiven Zellen 48 Stunden nach der Gabe von G-CSF im Blut von Fall 2 im FSC/SSC-Dotplot;

Fig. 4 den Anteil an Annexin-V-positiven Zellen nach Reduktion in der Magnetseparation im Fall 2;

Fig. 5 die Anreicherung an Annexin-V-positiven Zellen nach Magnetseparation im Fall 2;

Fig. 6 den Phänotyp der Annexin-V-positiven Zellen nach Pappenheim-Färbung.

Die **Fig. 1** bis **6** zeigen Ergebnisse zweier Probandenfälle, bei denen das erfindungsgemäße Verfahren angewandt wurde.

In beiden Fällen wurden 300 ml heparinisiertes venöses Vollblut eines gesunden Spenders, der 48 bzw. 24 Stunden zuvor einmalig mit 300 µg rhu G-CSF subcutan behandelt wurde, mit Hydroxyethylstärke (6%) in einem Verhältnis von 1 : 2 gemischt. Das Vollblut wurde dabei durch einfache Blutabnahme gewonnen. Die Erythrozyten wurden durch Sedimentation für 30 Minuten bei Raumtemperatur aus dem Vollblut abgetrennt. Der leukozytenhaltige Überstand wurde abgenommen und mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung ohne Magnesium und Kalzium (PBS-MC) in einem Verhältnis von 1 : 1 gemischt. Die Leukozyten wurden daraufhin in Granulozyten und mononukleäre Zellen über einen Ficoll-Dichtegradienten (20 Minuten, 750 × g) aufgetrennt. Der Überstand dieses Dichtegradienten wurde entfernt und das granulozytenhaltige Sediment gesammelt. Anschließend wurde das granulozytenhaltige Sediment durch hypotone Lyse von kontaminierenden Erythrozyten gereinigt. Eine Probengewinnung durch Aphaese wäre ebenfalls möglich. Die Zellen wurden gezählt und in einen kalziumhaltigen Puffer überführt. Der die Granulozyten enthaltende kalziumhaltige Puffer wurde zu Annexin V-beladenen magnetischen Beads gegeben und diese Mischung anschließend inkubiert. Während dieser Inkubation banden diese Vorläuferzellen der Granulozyten an das Annexin V und wurden so mit den magnetischen Beads gekoppelt. Die Annexin V-positive Zellen wurden anschließend über eine Säule magnetisch mit den Beads entfernt. Die Annexin V-negative Zellen enthaltende Lösung wurde anschließend mittels durchflußzytometrischer Analyse an einem FACScan (Becton Dickinson) gemessen und mit den Zellen der unseparierten Fraktion verglichen.

Die durchflußzytometrische Analyse der angereicherten Granulozytenfraktion des Probandenfalls 1, der einmalig mit G-CSF 300 µg s.c. behandelt worden war, zeigt gemäß **Fig. 1a** den Anteil an Annexin V positiven Zellen nach 24 Stunden. **Fig. 1a** ist dabei ein FSC/SSC-Dotplot (Forward Scatter/Side Scatter-Dotplot), wobei mit R1 der Meßbereich angegeben ist, dessen Meßwerte dem Anteil Annexin V positiver Zellen entspricht. Der Bereich R2 entspricht dabei funktionell aktiven neutrophilen Granulozyten. **Fig. 1b** zeigt im FL 1-Histogramm die Anteile der einzelnen Fraktionen an Vorläuferzellen der Granulozyten und intakten Granulozyten in den einzelnen Bereichen R1 bzw. R2. Dabei entspricht die mit G1 bezeichnete Kurve den Messungen, die bei der Beschränkung der Messung auf ein Fenster gemäß dem Bereich R1 in **Fig. 1a** bestimmt wurden. Die Kurve G2 wurde mit einem Fenster gemäß dem Bereich R2 in **Fig. 1a** aufgezeichnet. **Fig. 2a** und **Fig. 2b** zeigen dieselben Messungen 48 Stunden nach Gabe des G-CSF wobei die Bezeichnungen R1, R2 und G1 und G2 wie in **Fig. 1a** und **1b** verwendet werden. Wie unmittelbar in den **Fig. 1a, 1b, 2a** und **2b** zu erkennen ist, zeigt sich die Anwesenheit von Annexin V positiven Zellen im peripheren Blut.

Auch **Fig. 3**, die Messungen am Probandenfall 2 beschreibt, zeigt einen Anteil von Annexin V-positiven Zellen 48 Stunden nach der Gabe von G-CSF. Wie im Vergleich zu **Fig. 2a** gesehen werden kann, ist auch hier ein Anteil myeloischer, FITC-markierter Vorläuferzellen zu erkennen. **Fig. 4** zeigt weiterhin die Ergebnisse eines FSC/SSC-Dot-Plot nach Reduktion des Anteils an Annexin V positiven Zellen in der in **Fig. 3** dargestellten Probe über Magnetseparation. Diese Ergebnisse lassen sich bei mehrfacher Wiederholung des Separations/Aufreinigungsschrittes weiter verbessern. Demgegenüber zeigt **Fig. 5** eine Fraktion, bei der der Anteil von Annexin V positiven Zellen angereichert wurde. Ausgangspunkt war wiederum das bei **Fig. 3** beschriebene Material des Probandenfalls 2. Es ist unmittelbar zu erkennen,

daß die im Bereich R1 angesiedelten Annexin V-positiven myeloischen Vorläuferzellen gegenüber den in dem Bereich R2 angesiedelten neutrophilen, intakten Granulozyten stark angereichert sind. **Fig. 6** zeigt den Phänotyp der Annexin V-positiven Zellen nach Pappenheim-Färbung aus dem Präparat des Probandenfalles 2. Dabei wurden Zellen ausgewählt, die sich in dem Bereich R1 gemäß **Fig. 3** befinden. Die hier dargestellten myeloischen Vorläuferzellen entsprechen einem Anteil von ca. 20 bis 50%. Sie bestehen aus unreifen Zellen mit mononukleärem Charakter. Weiterhin sind normale Granulozyten zu erkennen, die durch segmentierte Kerne auffallen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufreinigung von Granulozyten enthaltenden Präparaten, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nicht funktionellen Granulozyten, insbesondere Vorläuferzellen von Granulozyten aus dem Präparat abgetrennt werden.
2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen des Präparates mit Annexin V oder Antikörpern, die Vorläuferzellen erkennen, inkubiert wird.
3. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation in Granulozyten mit an Trägermaterial gebundenem Annexin V in Gegenwart von Kalziumionen erfolgt.
4. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat mit einem Trägermaterial inkubiert wird, an dessen Oberfläche Annexin V oder Antikörpern, die Vorläuferzellen der Granulozyten erkennen, gekoppelt sind.
5. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial magnetische Beads enthält.
6. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß an die Mischung aus magnetischen Beads und Präparat ein Magnetfeld angelegt und die magnetischen Beads und das Präparat getrennt werden.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung des Trägermaterials und des Präparates durch Panningschritte oder Magnetseparation erfolgt.
8. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat mit markiertem Annexin V oder mit markierten Antikörpern inkubiert und anschließend die markierten Granulozyten ausgelesen werden.
9. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat mit fluorochromgekoppeltem Annexin V oder fluorochromgekoppelten Antikörpern inkubiert wird und anschließend die fluoreszenzmarkierten Granulozyten aus dem Präparat abgetrennt werden.
10. Verfahren nach mindestens einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung der markierten Granulozyten durch Chromatographie, insbesondere Säulenchromatographie, oder in einem Sorter erfolgt.
11. Granulozyten enthaltendes Präparat, das nach einem Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche behandelt wurde.
12. Verwendung von Granulozyten enthaltenden Präparaten nach dem vorhergehenden Anspruch in der Transfusionsmedizin, Hämatologie, Onkologie, Blutspende, Pädiatrie, insbesondere zur Behandlung von antibiotisch schwer zu beherrschenden Infektionen, sowie zur Prophylaxe bei Patienten mit hohem Infektionsrisiko.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

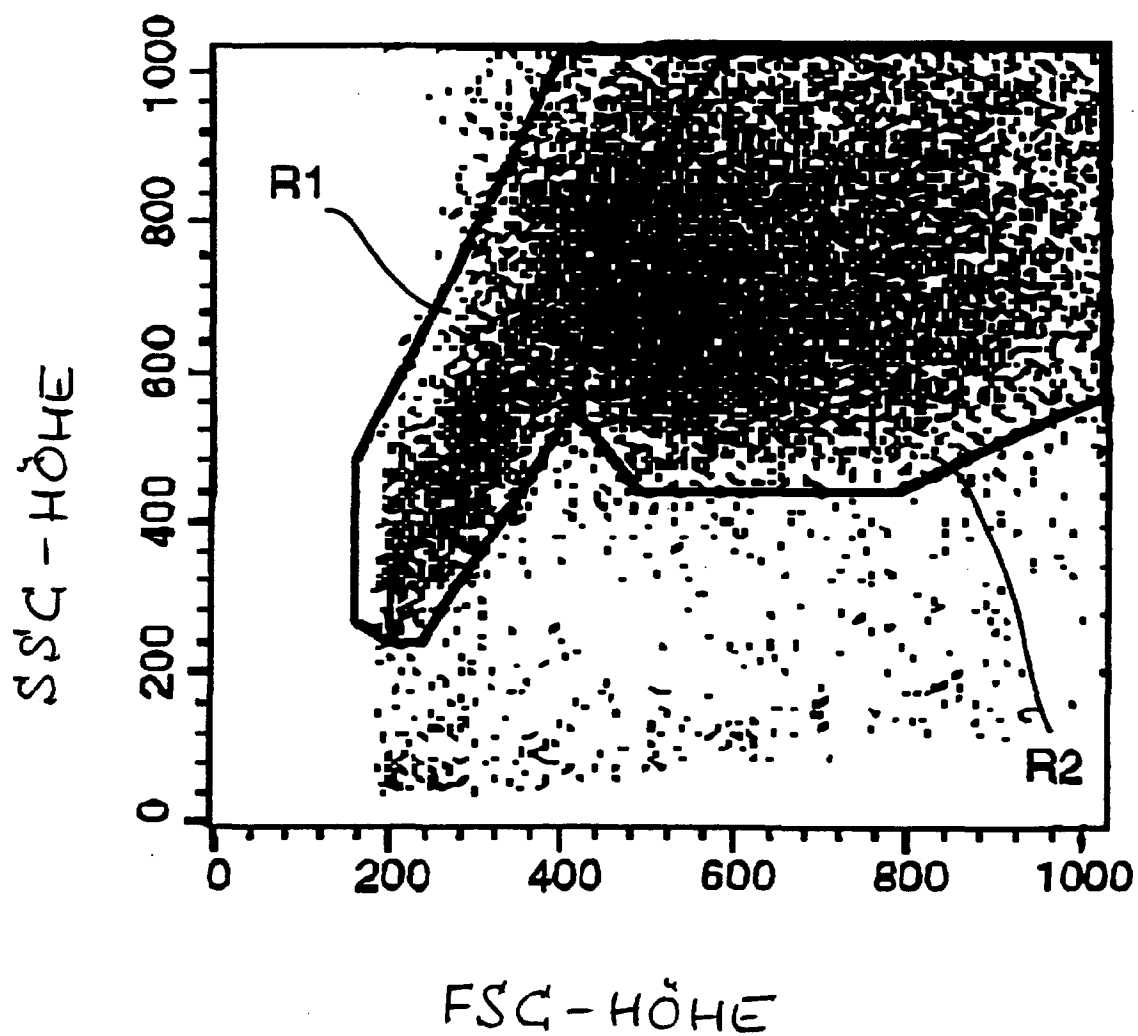


Fig. 1A

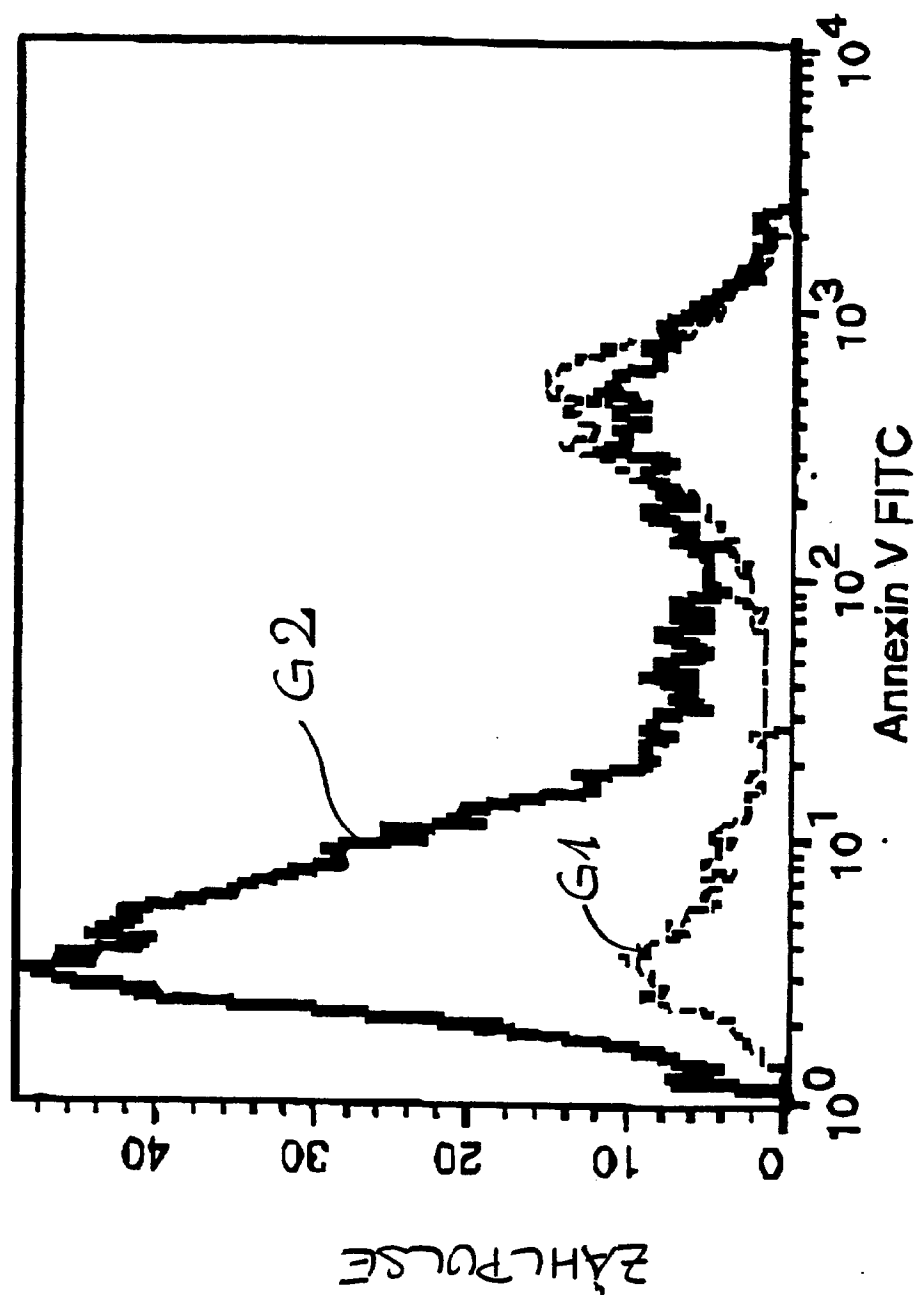


Fig. 1B

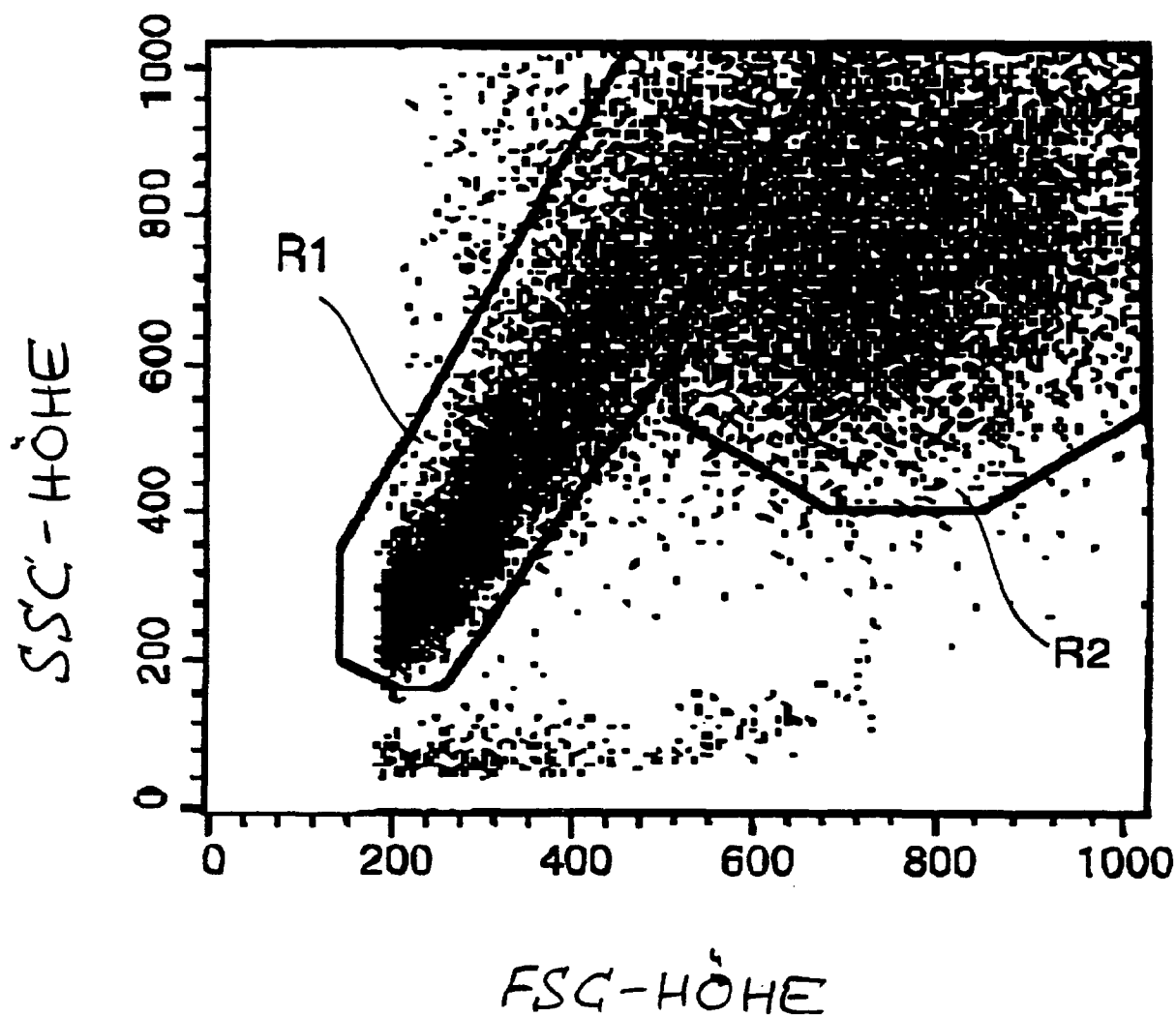


Fig. 2A

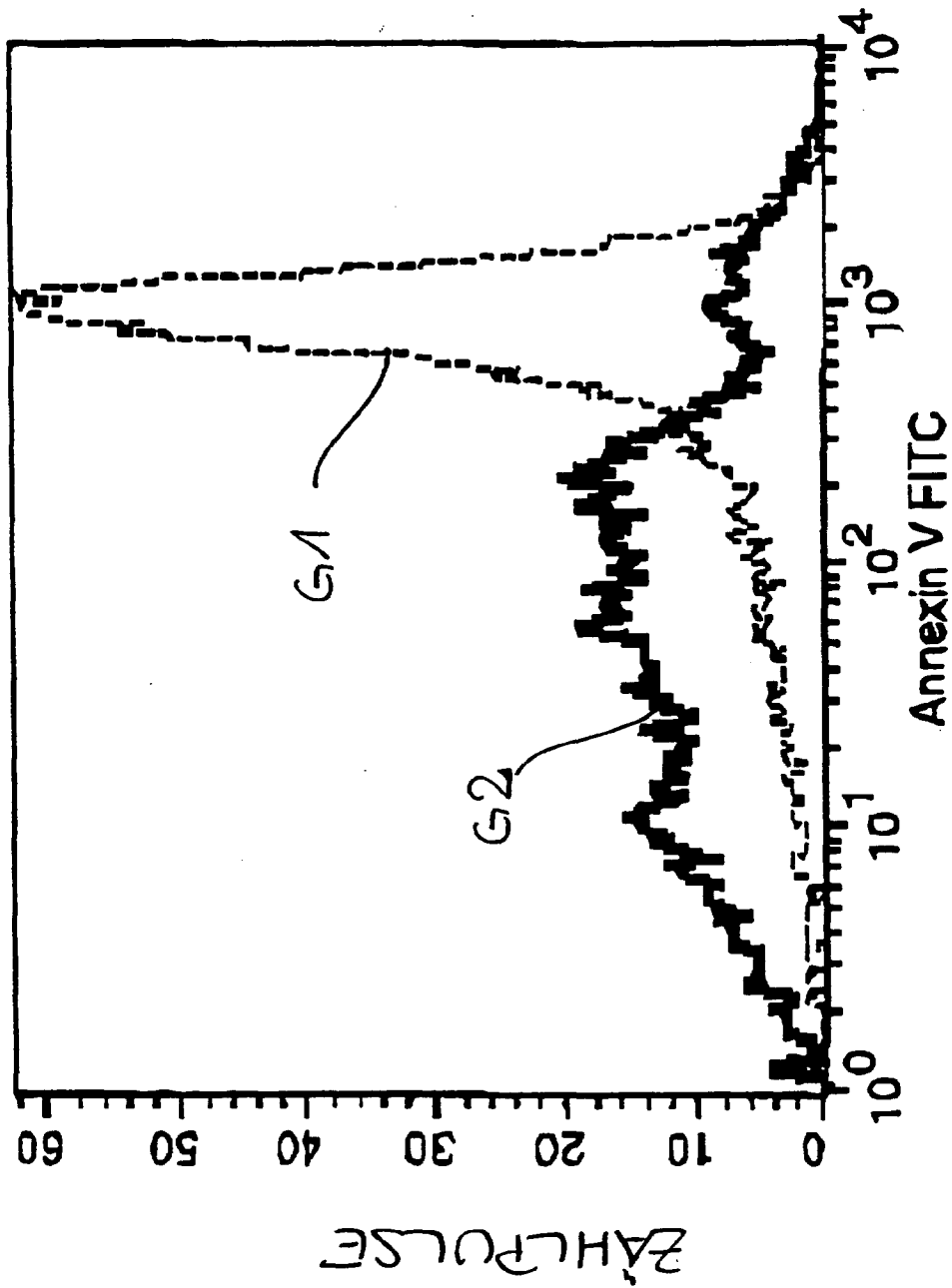


Fig. 2B

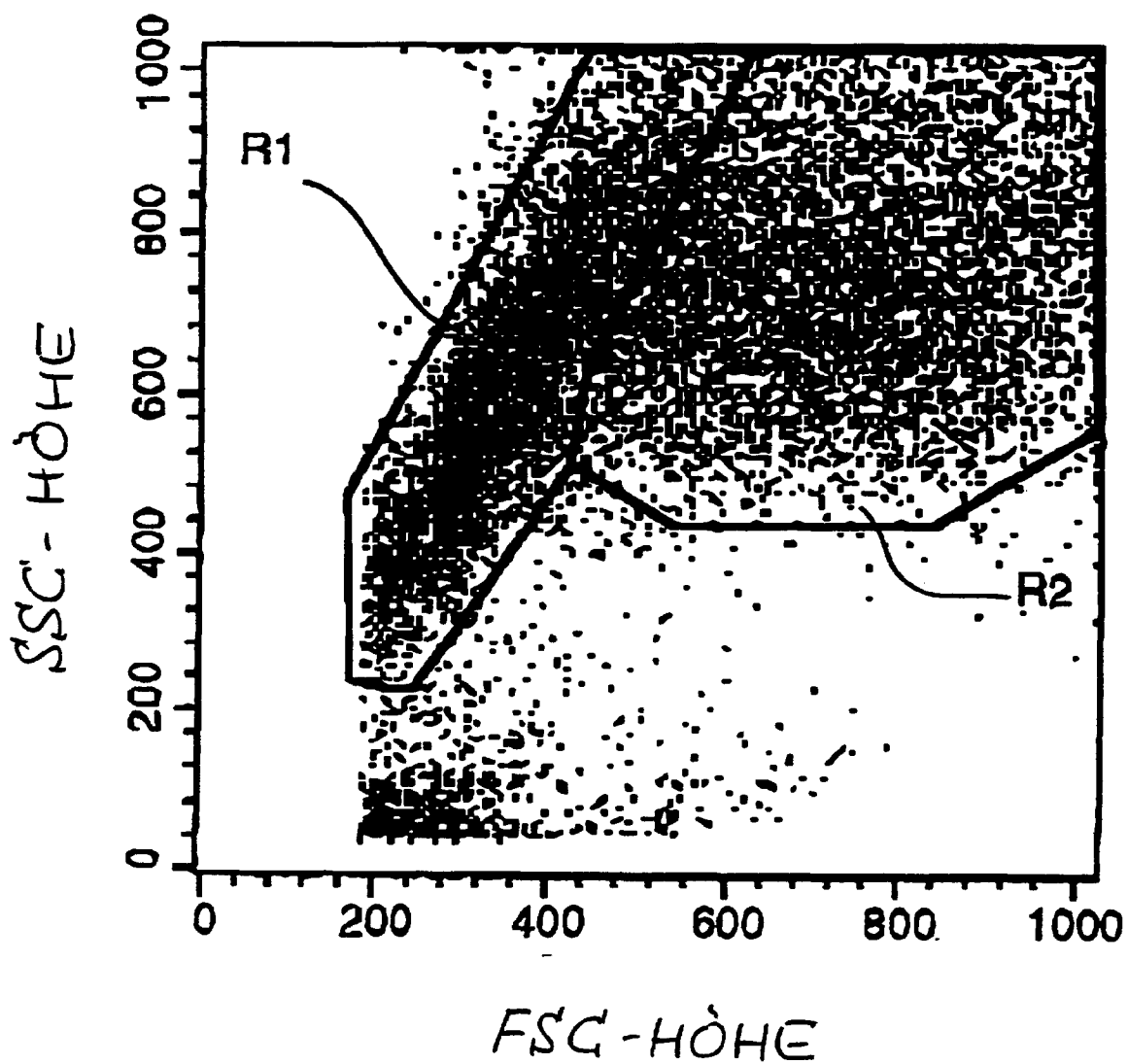


Fig. 3

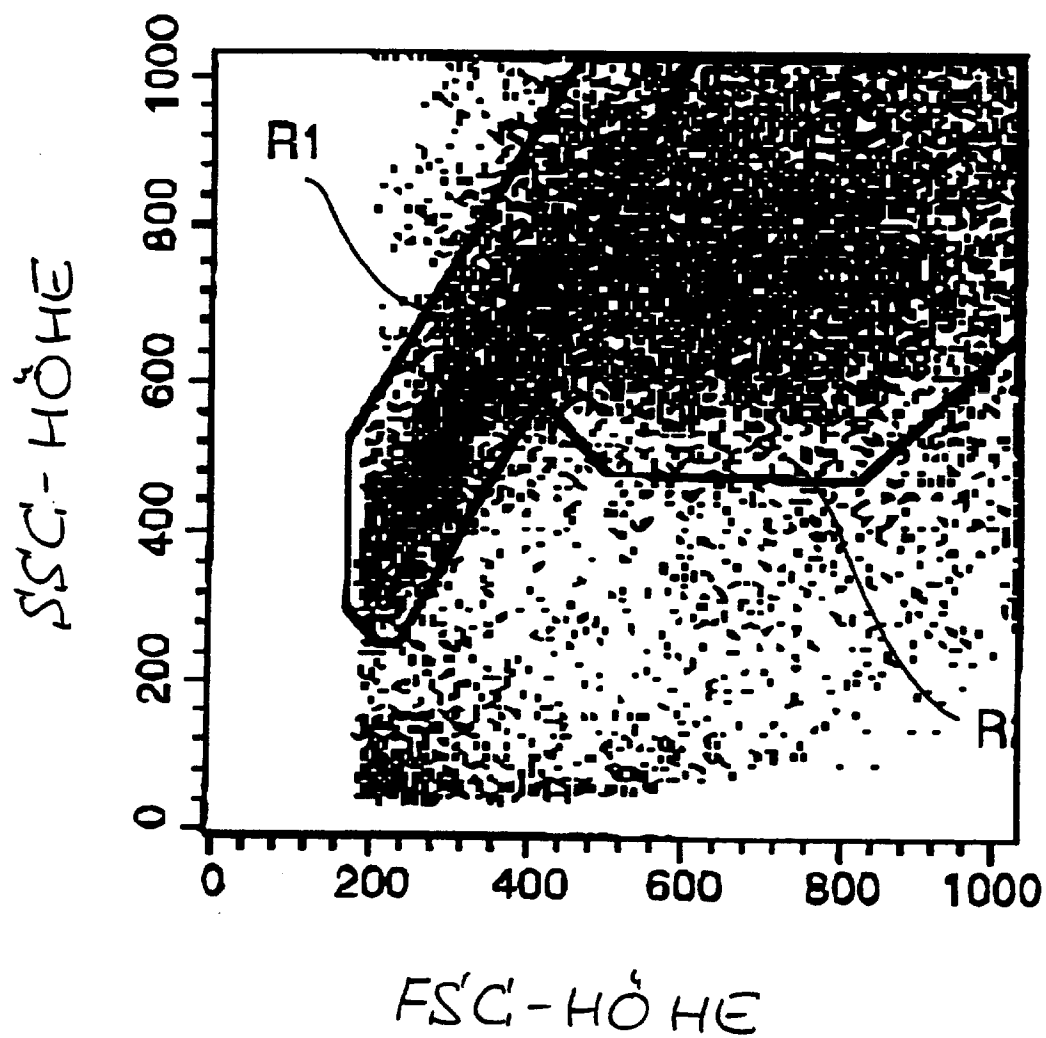


Fig. 4

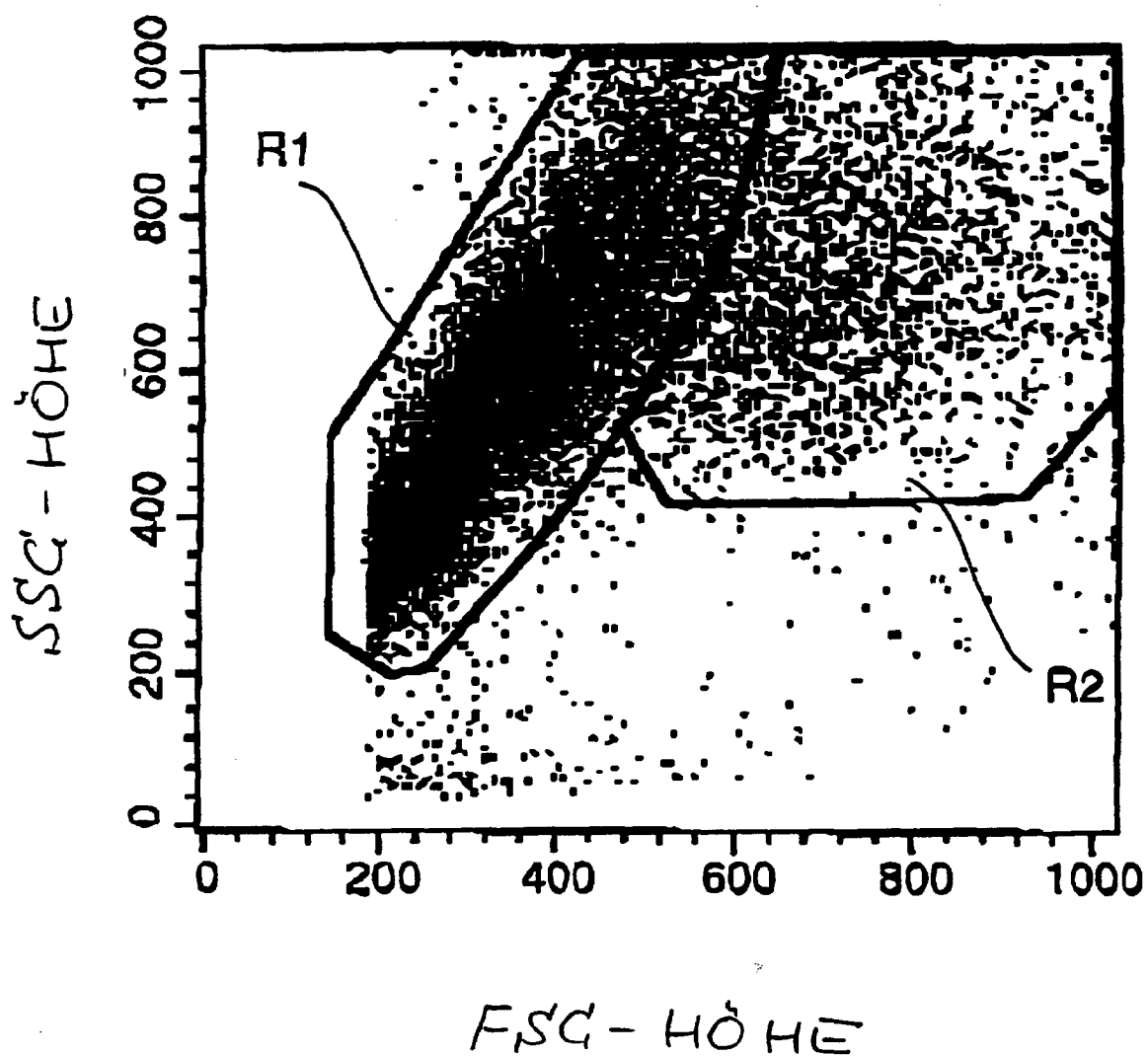


Fig. 5

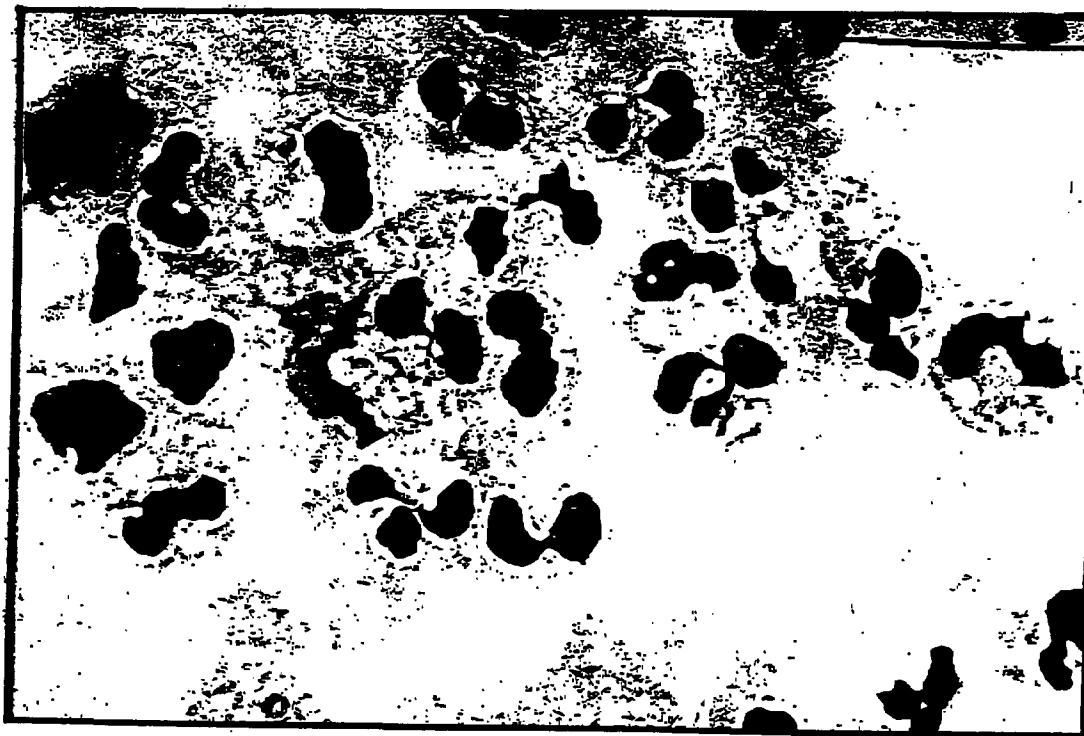


Fig. 6